

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Rec'd PCT/PTO 08 OCT 2004

10/510628

REC'D 01 SEP 2003

WIPO

PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 16 005.8

Anmeldetag: 11. April 2002

Anmelder/Inhaber: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, München/DE;
Professor Dr. Peter Hegemann, Barbing/DE.

Bezeichnung: Verwendung von biologischen Photorezeptoren
als direkt lichtgesteuerte Ionenkanäle

IPC: C 07 K, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 14. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hintermeier

Verwendung von biologischen Photorezeptoren als
direkt lichtgesteuerte Ionenkanäle

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von biologischen Photorezeptoren als direkt lichtgesteuerte Ionenkanäle.

Es ist seit längerem bekannt, dass eine Vielzahl zentraler Vorgänge in pflanzlichen und tierischen Zellen ganz oder teilweise über Änderungen der intrazellulären Konzentration bestimmter Ionen, beispielsweise der Protonenkonzentration, und Änderungen des Membranpotentials und der Ionengradienten über die Membran gesteuert wird. Dementsprechend ist die Aufklärung von Mechanismen der intrazellulären Ionen-Regulation, insbesondere der pH-Regulation, und der Mechanismen von spannungsabhängigen Ionenkanälen und Ionentransportern Gegenstand ausgedehnter Forschungsaktivitäten. Für solche Forschungen ist eine schnelle und leichte Messung und/oder Manipulation von intrazellulären Ionenkonzentrationen, insbesondere Protonenkonzentrationen, sowie von elektrischen Gradienten und Ionengradienten, insbesondere Protonengradienten, über Zellmembranen von großem Interesse.

Ein grundsätzlich sehr vorteilhafter Weg zur Ermöglichung solcher Messungen und/oder Manipulationen wäre die Einführung eines lichtgesteuerten Ionenkanals in eine solche Membran, um gezielt das Membranpotential und/oder den Fluß bestimmter Ionen, z. B. Protonen, durch die Membran zu verändern.

Im Stand der Technik sind eine Reihe lichtgesteuerter Ionentransportsysteme bekannt. Man unterscheidet dabei zwischen passiven und aktiven Ionentransportsystemen. Bei den passiven Ionentransportsystemen stehen die eigentlichen Transportmoleküle, die sogenannten Ionenkanäle, in Wechselwirkung mit separaten Photorezeptor-Komplexen und werden indirekt über diese Photorezeptoren gesteuert. Beispiele für solche mit einem Ionenkanal wechselwirkenden Photorezeptor-Komplexe sind die G-Protein aktivierenden Rhodopsine; s. z. B. Müller, F., Kaupp, U. B., Signaltransduktion in Sehzellen, Naturwissenschaften 85 (1998) 49-61. Da

diese bekannten passiven Ionentransportsysteme das Zusammenwirken mehrerer Proteine und anderer Komponenten erfordern, ist es problematisch, sie unter Beibehaltung ihrer Funktion, z. B. durch Co-Expression der entsprechenden Proteine in rekombinanten Systemen, in andere Zellen einzuführen.

Beispiele für lichtgesteuerte aktive Ionentransportmoleküle in einer Zellmembran sind die Rhodopsine aus Archaeen (Archaeobakterien). Ein bekannter Vertreter eines Archaeen-Rhodopsins ist das Bakteriorhodopsin, bestehend aus einer Proteinkomponente, dem Bakterioropsin, und einem über eine Schiff'sche Base gebundenen Retinal. Nach Anregung durch Licht geeigneter Wellenlänge transportiert Bakteriorhodopsin Protonen durch die Membran aus dem Zellinneren nach aussen. Der Ionentransport verläuft in der Regel langsam ($< 100 \text{ H}^+/\text{Sekunde}$) und die Transportrichtung des Bakteriorhodopsins kann nicht frei bestimmt werden. *In vivo* befördert Bakteriorhodopsin Protonen auch gegen einen bestehenden elektrochemischen Gradienten, der sich aus einem pH-Gradienten und einem elektrischem Gradienten $\Delta\Psi$ zusammensetzt. Eine solche lichtgesteuerte Protonenpumpe stellt ein vergleichsweise einfaches System dar. Bakteriorhodopsin und verwandte Retinal-bindende Proteine wie die Chloridpumpe Halorhodopsin wurden bereits heterolog exprimiert und waren im heterogenen Wirt zum lichtgetriebenen aktiven Membrantransport von Ionen, z. B. H^+ oder Cl^- , in der Lage.

Für viele Zwecke sind die bekannten Systeme aufgrund ihrer Komplexität bzw. der vorgegebenen Transportrichtung jedoch ungeeignet.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein neues lichtgesteuertes passives Ionentransportsystem, d. h., einen lichtgesteuerten Ionenkanal, bereitzustellen, das bei der Inkorporation in eine Zellmembran die schnelle und leichte Messung und/oder Manipulation von intrazellulären Ionenkonzentrationen, insbesondere Protonenkonzentrationen, sowie von elektrischen Gradienten über eine Zellmembran erlaubt.

Eine weitere Aufgabe ist es, ein System, das für das Hochdurchsatzscreening von biologischen Molekülen, insbesondere von pH-regulatorischen Membranproteinen und spannungsabhängigen Membranproteinen geeignet ist, bereitzustellen.

Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgaben durch die Verwendung einer neuen Klasse von Photorezeptoren mit bisher unbekannter Funktion, die direkt lichtgesteuerte passive Ionentransportsysteme (einen lichtgesteuerten Ionenkanal) darstellen. Dieser Photorezeptor umfasst ein Apoprotein, das eine Ionenleitfähigkeit vermittelt, und ein kovalent an das Apoprotein gebundenes lichtsensitives Polyen, das mit dem Apoprotein wechselwirkt und als lichtempfindliches Tor fungiert. Überraschenderweise ist es erfindungsgemäß gelungen, die Vorteile eines relativ einfachen direkt lichtgesteuerten Systems mit den Vorteilen eines passiven Ionenkanals zu verbinden.

Bei dem Apoprotein handelt es sich um ein Membranprotein mit mindestens 5 Transmembranhelices, das zur Bindung eines lichtsensitiven Polyens fähig ist. Bevorzugt sind Transmembranproteine mit 6 oder 7 Transmembranhelices. Transmembranproteine mit mehr als 7 Helices, beispielsweise 8, 9 oder 10 Transmembranhelices, sind von der Erfindung jedoch ebenfalls umfasst. Darüber hinaus umfasst die Erfindung Transmembranproteine, die zusätzlich zu dem Transmembrananteil C- und/oder N-terminale Sequenzen enthalten, wobei die C-terminalen Sequenzen in das Innere des von der Membran umschlossenen Lumens, beispielsweise das Cytoplasma einer Zelle oder das Innere eines Liposomes, hineinreichen können, oder auch an der Membranaussenoberfläche angeordnet sein können. Das gleiche gilt für die gegebenenfalls vorhandenen N-terminalen Sequenzen, die ebenfalls sowohl intraluminal angeordnet sein können als auch auf der äusseren Oberfläche der Membran. Die Länge der C- und/oder N-terminalen Sequenzen unterliegt im Prinzip keiner Beschränkung; bevorzugt sind jedoch Apoproteine mit C-terminalen, nicht in die Membran eingebetteten Sequenzen mit 1 bis 1000 Aminosäuren, bevorzugt 1 bis 500, besonders bevorzugt 5 bis 50 Aminosäuren. Unabhängig von der Länge der C-terminalen Sequenzen umfassen die N-terminal angeordneten, nicht in die Membran eingebetteten Sequenzen bevorzugt 1 bis 500 Aminosäuren, besonders bevorzugt 5 bis 50 Aminosäuren.

Der Begriff der Transmembranhelix ist dem Fachmann bekannt. Generell handelt es sich um α -helicale Proteinstrukturen, die in der Regel 20 bis 25 Aminosäuren umfassen. Je nach Beschaffenheit der Membran, bei der es sich um eine natürliche Membran, beispielsweise eine Zell- oder Plasmamembran, oder auch eine

synthetische Membran handeln kann, können die Transmembransegmente jedoch auch kürzer oder länger sein. Beispielsweise können Transmembransegmente in artifiziellen Membranen bis zu 30 Aminosäuren umfassen, andererseits aber auch nur wenige Aminosäuren, zum Beispiel 12 bis 16.

Der erfindungsgemäße Ionenkanal kann prinzipiell dem passiven Transport aller physiologisch wichtigen Ionen dienen. Die bekanntesten Ionentransportsysteme transportieren Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ oder Cl^- . In einer bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Ionenkanal ein Protonenkanal.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst der Protonenkanal als Apoproteinanteil ein Opsin-Protein oder ein Derivat oder Fragment eines natürlich vorkommenden Opsinproteins. Als Opsine werden hier Apoproteine bezeichnet, die kovalent mit einem Retinoid-Chromophor verbunden sind und Ionenleitfähigkeit aufweisen, sobald sie Licht absorbieren. Ein Molekül, das kovalent mit einem Opsin verbundenes Retinoid-Chromophor enthält, wird als Rhodopsin bezeichnet.

Ein Derivat eines natürlich vorkommenden und als lichtgeschalteter Ionenkanal fungierenden Opsinmoleküles ist dem Original gegenüber durch einen Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren, durch eine Insertion und/oder eine Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren an einer oder mehreren Positionen verändert. Sowohl die natürlich vorkommenden Opsinmoleküle als auch ihre Derivate sollten im Bereich der 5 Transmembranhelices, die den Helices 3 bis 7 im Bakteriorhodopsin entsprechen, eine Identität von mindestens 15 % mit der Sequenz des Bakteriorhodopsins aufweisen. Eine Identität von 20 % oder mehr zwischen dem Derivat eines Opsins und Bakteriorhodopsin, bezogen nur auf den Bereich der Helices 3 bis 7 in Bakteriorhodopsin, ist dabei bevorzugt. Die Identität in den Bereichen des Opsinderivates, die nicht den Helices 3 bis 7 entsprechen, kann dagegen weitaus geringer sein.

Mit dem Begriff „Identität“ wird dabei der Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr Proteinsequenzen bezeichnet, der durch die Übereinstimmung zwischen diesen Sequenzen bestimmt wird. Der Prozentsatz der Identität ergibt sich aus dem

Prozentsatz identischer Aminosäuren in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken und anderen Sequenzbesonderheiten.

Die Identität miteinander verwandter Protein-Moleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Identität zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux et al., 1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul et al., 1990). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Identität verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Sequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus: Altschul et al., 1990 (Basic local alignment search tool, J Mol. Biol. 215, 403-410) (=BLAST)

Vergleichsmatrix: BLOSUM 62 (Henikoff and Henikoff, 1992, Amino acid substitutions from protein blocks. PNAS 89, 10915-10919)

Übereinstimmung (matches) = variabel

Nichtübereinstimmung (mismatch) = variabel

Lücken-Wert: open 10

Lückenzlängen-Wert (Gap length penalty): 1

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Standardparameter (default parameters) für Protein-Vergleiche.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenzlängen-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten, können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem

durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Für die aktive Protonenpumpe Bakteriorhodopsin ist bekannt, dass Asp(D)⁹⁶ eine für die Protonenpumpfunktion essentielle Aminosäure ist. Weiter sind die folgenden 16 Aminosäuren des Bakteriorhodopsins am Protonennetzwerk beteiligt:

F⁴², T⁴⁶, Y⁵⁷, R⁸², D⁸⁵, T⁸⁹, L⁹³, T¹⁰⁷, W¹⁸², Y¹⁸⁵, W¹⁸⁹, E¹⁹⁴, E²⁰⁴, D²¹², K²¹⁶, F²¹⁹

Im erfindungsgemässen Ionenkanal ist an der dem D⁹⁶ der Bakteriorhodopsinsequenz entsprechenden Position eine andere Aminosäure als „D“. E²⁰⁴ ist vorzugsweise ausgetauscht durch S. In einer Ausführungsform sind von den weiteren 15 Aminosäuren jedoch mindestens 8 identisch erhalten oder lediglich durch konservativen Austausch verändert. Bei den Aminosäuren, die möglichst identisch erhalten sein sollten, handelt es sich bevorzugt um T⁴⁶, Y⁵⁷, R⁸², T⁸⁹, T¹⁰⁷, W¹⁸², E¹⁹⁴, D²¹² und K²¹⁶. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind bevorzugt F⁴², D⁸⁵, L⁹³, Y¹⁸⁵, W¹⁸⁹ und F²¹⁹. Der Fachmann weiß dabei, dass für einen konservativen Austausch eine Aminosäure ausgewählt wird, die der auszutauschenden Aminosäure funktionell ähnlich ist. Dabei werden Austausche normalerweise innerhalb der folgenden Gruppen vorgenommen:

- | | | | | | |
|-----|---------|---------|----------|----------|----------|
| (a) | Ala (A) | Ser (S) | Thr (T) | Pro (P) | Gly (G); |
| (b) | Asn (N) | Asp (D) | Glu (E) | Gln (Q); | |
| (c) | His (H) | Arg (R) | Lys (K) | | |
| (d) | Met (M) | Leu (L) | Ile (I) | Val (V) | und |
| (e) | Phe (F) | Tyr (Y) | Trp (W). | | |

Bezogen auf die oben angegebenen Aminosäuren, sind bevorzugte Austausche die folgenden: F42Y, D85E, Y185F, W189F und F219W.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind ein oder mehrere weitere der

folgenden Positionen, bezogen auf Bakteriorhodopsin, im erfindungsgemässen Ionenkanal erhalten: Y⁸³, W⁸⁶, P⁹¹, G¹²², P¹⁸⁶ und G¹⁹⁵.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemässer passiver Protonenkanal ein Apoprotein mit der Konsensussequenz L(I)DxxxKxxW(F,Y). In Klammern angegebene Aminosäuren können jeweils die vorhergehende Aminosäure ersetzen. Bei dieser Konsensussequenz handelt es sich um das die Retinal-bindende Aminosäure Lysin umgebende Motiv. Im Bakteriorhodopsin entspricht das „K“ an Position 6 der Konsensussequenz dem K²¹⁶ in der 7. Helix des Bakteriorhodopsins.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Ionenkanal ein Apoprotein aus niederen Eukaryonten. Die Gruppe der niederen Eukaryonten umfasst beispielsweise Algen, Protozoen, Ciliaten und Hefen.

Besonders bevorzugt sind dabei motile Grünalgen, insbesondere Chlorophyceen. Apoproteine aus Volvocales sind dabei besonders interessant. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform ist das Apoprotein ein Opsinprotein aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Weitere Grünalgen mit bevorzugten Ausführungsformen sind zu finden unter den Ulvophyten wie *Acetabularia* und *Ulva*. Weitere bevorzugte Ausführungsformen sind Opsine aus Prasinophyceen, beispielsweise *Pyramimonas* und *Platymonas (Tetraselmis)*. Andere bevorzugte Formen stammen aus dem Königreich der Dinophyten mit der einzigen Klasse der Dinophyceae und den beispielhaften Vertretern *Gymnodinium splendens*, *Gyrodinium dorsum*, *Peridinium balticum* und *Gonyaulax*.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt das als lichtgesteuerter Ionenkanal fungierende Opsin aus einem Protozoon, einem Bakterium oder einem Archaeobakterium.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt das als lichtgesteuerter Ionenkanal fungierende Opsin aus Pilzen wie *Neurospora crassa*, *Fusarium sporotrichioides* and *Leptosphaeria maculans*, oder *Chytridiomyceten* wie z. B.

Allomyces reticulatus, oder aus Ciliaten wie *Fabrea salina* oder *Paramecium bursaria* oder aus Foraminiferen wie *Amphistegina radiata*.

Erfindungsgemäss wurden aus *Chlamydomonas reinhardtii* zwei verschiedene Proteine mit bekannter Sequenz funktionell exprimiert und erstmals als passive Ionentransportsysteme identifiziert. Dabei handelt es sich um das Channelopsin1 (= CHOP-1; auch Chlamyopsin-3 = COP3 genannt) und das Channelopsin2 (= CHOP-2; auch Chlamyopsin-4 = COP4 genannt).

Das CHOP-1-Protein weist ein Molekulargewicht von 76 kD und eine Länge von 712 Aminosäuren auf. Es wurde anhand von überlappenden partiellen cDNA-Sequenzen in einer *C. reinhardtii*-EST-Datenbank (Asamizu et al., *DNA Research* 7, 305-7 (2000)) identifiziert. Seine Aminosäuresequenz ist in Fig. 1 der vorliegenden Anmeldung dargestellt. Das Core-Protein (Aminosäuren 76 –309) umfasst 7 hypothetische Transmembran-Segmente mit 15-20% Homologie zu den sensorischen Archaeen-Rhodopsinen, den Ionentransportern Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR), sowie zu einem erst kürzlich identifizierten Rhodopsin aus dem Pilz *Neurospora crassa* (NOP1). Diese Homologiegrade sind zwar quantitativ relativ gering, es sind jedoch im Vergleich zu BR speziell diejenigen Aminosäuren konserviert, welche die Retinal-Bindungsstelle und das H⁺-Transport-Netzwerk in BR definieren. Das beobachtete Konsensus-Motiv LDxxxKxxW legt nahe, dass im CHOP-1 K²⁹⁶ die Retinal-bindende Aminosäure ist. 9 von 22 Aminosäuren, welche im Bakteriorhodopsin in direktem Kontakt mit dem Retinal stehen, sind in CHOP-1 identisch erhalten und 4 weitere reflektieren lediglich konservative Änderungen ((Abb.1); Nagel et al., in Vorbereitung).

Eingehende Untersuchungen der lichtgesteuerten Ionentransportfunktion des CHOP-1-Proteins in Oozyten von *Xenopus laevis* zeigten, dass es sich bei den transportierten Ionen um Protonen handelt (Fig. 3), ausserdem, dass der Ionentransport rein passiver Natur ist (Fig. 4a-c). Der induzierte Photostrom und damit der Ionentransport ist von der Wellenlänge des Anregungslichtes abhängig und erreicht ein Maximum bei 500 nm (Fig. 4d).

Analoge Versuche mit zwei kürzeren Fragmenten des CHOP-1-Proteins, welche die Aminosäuren 1-346 bzw. 1-517 umfassten, lieferten Ergebnisse, welche mit denjenigen des CHOP-1-Proteins vollständiger Länge im Wesentlichen identisch waren. Dies demonstriert, dass ein großer Teil des carboxyterminalen Bereichs des CHOP-1-Proteins für die Ionentransportfunktion nicht erforderlich ist.

Das CHOP-1-Protein aus *C. reinhardtii* stellt den ersten identifizierten Vertreter eines neuen direkt lichtgesteuerten passiven Ionentransportproteins dar. Strukturell und/oder funktionell ähnliche Rhodopsin-Proteine kommen auch in anderen Mikroalgen sowie in Gameten und Zoosporen von Makroalgen und möglicherweise auch in anderen Organismen vor.

Das zweite als lichtgeschalteter Ionenkanal identifizierte Protein ist Channelopsin2 (CHOP-2), dessen 737 Aminosäuren umfassende Sequenz ebenfalls in Figur 1 gezeigt ist. Es zeigt eine Homologie von 52.7 % zu CHOP-1. Die über die Homologie zwischen BR und CHOP-1 sowie Modellberechnungen identifizierten, für den Transport wichtigen Aminosäuren sind auch in CHOP-2 weitgehend konserviert. Auch für dieses Rhodopsin wurde eine lichtgeschaltete passive Protonenleitfähigkeit durch Expression in *Xenopus*-Oocyten erstmalig nachgewiesen. CHOP-2 unterscheidet sich von CHOP-1 hinsichtlich seiner Einheitsleitfähigkeit, seiner Inaktivierung im Dauerlicht und der Form der Strom-Spannungskurve.

Aufbauend auf der vorliegenden Erfindung ist der Fachmann in der Lage, Derivate der ursprünglichen Aminosäuresequenz in Kenntnis der Nukleotid- und Aminosäuresequenz sowie der berechneten 3D-Struktur des natürlichen CHOP-1- und CHOP-2-Proteins, durch Austausch und/oder Insertion und/oder Deletion von einer oder mehreren Aminosäure(n) herzustellen, welche die Ionentransporteigenschaften des ursprünglichen Proteins ganz oder teilweise behalten haben oder sich bezüglich Ionenspezifität, Inaktivierung, Gleichrichtung etc. signifikant unterscheiden. Derivate sind dabei wie oben angegeben definiert.

Aktive Systeme können von passiven Systemen elektrophysiologisch eindeutig und zweifelsfrei unterschieden werden, wie nachfolgend ausgeführt. Passive lichtgesteuerte Ionenkanäle, die Gegenstand der Erfindung sind, erhöhen im Licht

die Leitfähigkeit von Membranen, in die sie eingebaut sind, gegenüber dem Dunkelzustand. Die Ionenströme, die bei Belichtung auftreten (Photoströme), werden von der Ionenspezies getragen, die von dem lichtgesteuerten Ionenkanal geleitet wird. Bei gleicher Konzentration der geleiteten Ionen (in den Fällen von CHOP-1 und CHOP-2 Protonen) auf beiden Seiten der Membran (symmetrische Bedingungen) wird die Richtung des Photostroms allein durch das angelegte Membranpotential bestimmt. Im Falle eines positiven Ladungsträgers erfolgt bei negativem Potential (in der Zelle negativ) ein Einwärtsstrom unter Bewegung der positiv geladenen Ionen in die Zelle, bei positivem Potential (innen positiv) ein Auswärtsstrom unter Bewegung der positiv geladenen Ionen aus der Zelle heraus. Die Strom-Spannungskurven eines erfindungsgemäßen lichtgesteuerten Ionenkanals gehen bei symmetrischer Verteilung des transportierten Ions immer durch den Nullpunkt (Umkehrpotential $E_H=0$). Die Strom-Spannungskurven der erfindungsgemäßen lichtgesteuerten Ionenkanäle sind jedoch nicht notwendigerweise linear. In der bevorzugten Ausführungsform von CHOP-1 zum Beispiel wird der Strom in Einwärtsrichtung besser geleitet als in Auswärtsrichtung (Einwärtsgleichrichter, s. Abb. 2 und 3).

Im Gegensatz dazu geht bei allen aktiven Transportsystemen (wie z. B. Bakteriorhodopsin) die Strom-Spannungskurve bei symmetrischer Ionenverteilung nie durch Null. Die Einstellung einer Ungleichverteilung der geleiteten Ionen zwischen innen und außen hat eine Verschiebung der Strom-Spannungskurven entlang der Spannungsskala entsprechend der Nernst'schen Gleichung zur Folge, d. h. um 58 mV bei monovalenten Ionen, um 29 mV bei divalenten Ionen.

Durch Untersuchung der Strom-Spannungskurven kann daher für jeden lichtgesteuerten Ionenkanal festgestellt werden, ob es sich um ein passives oder aktives System handelt.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Derivate und Fragmente der CHOP-Proteine, welche die Ionentransporteigenschaften des ursprünglichen Proteins ganz oder teilweise behalten haben oder sogar in gesteigertem Maße aufweisen, sowie strukturell und funktionell ähnliche Opsine aus anderen Organismen, natürlicher Herkunft oder durch Anwendung rekombinanter Techniken modifiziert, wenn sie die

genannten biophysikalischen Eigenschaften aufweisen und wie CHOP-1 und CHOP-2 zu den genannten Zwecken eingesetzt werden können.

Das erfindungsgemässe passive Ionentransportsystem enthält ein lichtsensitives Polyen. Dabei kann es sich beispielsweise um p-Hydroxymethylsäure, Retinal oder ein Retinalderivat handeln. Bevorzugte Retinalderivate sind aus der folgenden Gruppe ausgewählt: 3,4-Dehydroretinal, 13-Ethylretinal, 9-dm-Retinal, 3-Hydroxyretinal, 4-Hydroxyretinal, Naphthylretinal; 3,7,11-Trimethyl-Dodeca-2,4,6,8,10-Pentaenal; 3,7-Dimethyl-Deca-2,4,6,8-Tetraenal; 3,7-Dimethyl-Octa-2,4,6-Trienal; sowie 6-7, oder 10-11-rotations-blockierte Retinale mit 4, 5, 6 oder 7-Ringverbrückungen. Besonders bevorzugt ist jedoch ein 10-12-Fünfring-verbrücktes Retinal (Takahashi et al. FEBS Lett. 314, 275-279).

Nach Lichtabsorption und Isomerisierung der Polyene kommt es in den erfindungsgemässen lichtgesteuerten Ionenkanälen zu einer strukturellen Änderung im Protein (Opsin) und damit zur Öffnung des Ionenleitenden Kanals, der die intrazelluläre Seite der Membran mit der extrazellulären verbindet. Dieses Ereignis unterscheidet sich grundsätzlich von der Situation in den bekannten Ionenpumpen, bei denen der extrazelluläre protonenleitende Halbkanal (EC) mit dem intrazellulären Halbkanal (IC) nie leitend verbunden ist. Im Bakteriorhodopsin ist die Schiff'sche Base des Retinal im frühen M-Intermediat des Reaktionszyklus (Photozyklus) mit der extrazellulären Seite leitend verbunden, im späten M-Zustand dagegen ist sie mit der intrazellulären Seite verbunden.

Die erfindungsgemässen lichtgesteuerten Ionenkanäle können in eine Membran, beispielsweise die Plasmamembran einer Zelle, eingebaut und dazu verwendet werden, das Membranpotential durch Belichtung schnell und definiert zu verändern, was zur Aufklärung der Mechanismen von spannungsabhängigen Ionenkanälen oder Ionentransportern sehr hilfreich ist. Ferner ergibt sich so die Möglichkeit, mit einem lichtgesteuerten gezielten Ionentransport die intrazellulären Niveaus dieser Ionen schnell und definiert zu verändern.

Im Falle des CHOP-1-Proteins bedeutet dies eine gezielte nicht-invasive Veränderung des intrazellulären pH-Werts, was zur Aufklärung der Mechanismen der

intrazellulären pH-Regulation bzw. des Einflusses von transienten pH-Änderungen auf zelleigene Proteine von Nutzen ist.

Durch die Messung des Umkehrpotentials der lichtinduzierten CHOP-1-vermittelten Protonenleitfähigkeit kann der intrazelluläre pH-Wert direkt unterhalb der Membran, bzw. ein pH-Gradient über die Membran bei Kenntnis des extrazellulären pHs schnell und genau gemessen werden. Hierzu wird mit der in Abb. 2-4 genannten „Voltage Clamp“ Messung das Umkehrpotential bestimmt und damit die Zellen geeicht. Nachfolgend kann die Modulation des Membranpotentials und/oder des intrazellulären pH-Werts mit Licht über den erfindungsgemässen lichtgesteuerten Ionenkanal nicht-invasiv erfolgen. Die entsprechenden Messungen erfolgen schnell und definiert und eignen sich so in idealer Weise für moderne HTS (High-Throughput-Screening)-Geräte, mit denen sich beispielsweise pH-regulierte spannungsabhängige Membranproteine wie Ionenkanäle in Screeninganwendungen mit hohem Durchsatz testen lassen. Spannungs- oder pH-Sprünge lassen sich in Zelllinien, die CHOP-1 oder verwandte Rhodopsine enthalten, mit Licht induzieren.

Eine besonders interessante Anwendung ist die optoelektrische Kopplung durch lichtgesteuerte Modulation des Membranpotentials. Diese Anwendung beruht auf einer Kombination des lichtgesteuerten passiven Ionenkanals mit einem lichtgesteuerten aktiven Ionentransportsystem, z. B. einer Ionenpumpe, wobei zur Lichtsteuerung des passiven Ionenkanals vorzugsweise eine andere Wellenlänge als zur Lichtsteuerung des aktiven Ionentransportsystems eingesetzt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird Licht einer Wellenlänge von 650 nm zur Aktivierung der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin und zum Aufbau eines Membranpotentials eingesetzt und anschließend Licht einer Wellenlänge von 440 nm, das auf Bakteriorhodopsin inhibitorisch wirkt, zur Aktivierung des CHOP-1-Protonentransportsystems und zur schnellen Dissipation des Potentials eingesetzt.

Lichtregulierte Ionenkanäle können auch bei der Signalübertragung von neuronalen Netzwerken auf Mikroelektrodenetze eingesetzt werden. Hierbei wird versucht, elektrische Impulse von Neuronen auf Mikrocomputer zu übertragen („Interfacing von Nervenzellen und Halbleitern“: Fromherz (2001), Physikalische Blätter 57, 43-48). Bislang mußten die Neuronen entweder über Neurotransmitter oder direkt mit

Mikropipetten stimuliert werden. Neuronen, die CHOP-1 oder verwandte lichtgesteuerte Ionenkanäle exprimieren, könnten über Licht gesteuert werden.

Eine weitere Anwendung ist die Therapie von blinden Tieren oder letztendlich Menschen. Es gibt einige Krankheiten, bei denen die natürlichen Sehzellen nicht mehr funktionieren, aber alle Nervenverbindungen weiterhin arbeiten können. Heute wird in verschiedenen Forschungszentren versucht, dünne Filme mit künstlichen keramischen Photozellen auf der Netzhaut zu implantieren (E. Zrenner (2002) Science 295, 1022-1025.) Diese Photozellen sollen dazu dienen, die sekundären noch intakten Zellen der Retina zu depolarisieren und damit einen Nervenimpuls auszulösen (*bionische Augen*). Die gezielte Expression von lichtgesteuerten Rhodopsinen wie CHOP-1 in diesen Ganglionzellen, Amacrinzellen oder bipolaren Zellen würde eine sehr viel elegantere Lösung darstellen und eine höhere räumliche visuelle Auflösung ermöglichen.

Der Einbau des erfindungsgemässen Rhodopsin-Ionentransportsystems in die Membran von Zellen, welche das entsprechende Opsin-Protein in der Natur nicht exprimieren, kann z. B. in einfacher Weise dadurch erfolgen, dass die für dieses Opsin kodierende DNA unter Anwendung bekannter Verfahren der rekombinanten DNA-Technologie zuerst in einen geeigneten Expressionsvektor, z. B. ein Plasmid, ein Cosmid oder ein Virus, eingebaut wird, damit anschließend die Zielzellen transformiert werden und das Protein in diesem Wirt exprimiert wird. Anschließend werden die Zellen in geeigneter Weise z. B. mit Retinal behandelt, um die Verbindung einer Schiff'schen Base zwischen Protein und Retinal zu ermöglichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform geschieht dieses in verschiedenen Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* wie bereits für aktive Rhodopsine wie Bakteriorhodopsin und/oder Rinderrhodopsin erfolgreich durchgeführt (Hildebrandt V, et al. (1989)) Genetic transfer of the pigment bacteriorhodopsin into the eukaryote *Schizosaccharomyces pombe*. FEBS Lett 243(2):137-40, Najmoutin G. et al. Heterologous expression of bovine opsins in *Pichia pastoris* Meth. Enzymol. (2000) 315, 3-11)

Die Expression kann auch in bestimmten Säugerzellsystemen erfolgen. Dieses geschieht entweder mit episomalen Vektoren als transiente Expression, vorzugsweise in COS-Zellen (generiert durch Infektion von „African green monkey kidney CV1“ Zellen) (Oprian et al. (1987) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 84, 8874ff) oder *human embryonic kidney* (HEK293 Zellen, Reeves et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 11487 ff) oder „baby mamster kidney“ Zellen (BHK), oder in Form einer stabilen Expression (durch Integration ins Genom) in chinese hamster ovary cells (CHO), myeloma Zellen oder Madine-Darby canine kidney (MDCK) Zellen (Übersicht in: Makrides SC (1999) *Prot. Expr Purif.* 17, 183-202) oder in durch Baculoviren infizierte Sf9 Insekten Zellen (Jansen et al. (1988) *Mol Biol. Rep.* 13, 65 ff).

Zur Gewährleistung oder Optimierung der Expression kann die kodierende DNA auch in geeigneter Weise modifiziert werden, beispielsweise durch Verknüpfung mit geeigneten regulatorischen Sequenzen und/oder durch Anpassung der kodierenden DNA-Sequenz an die bevorzugte Codonverwendung des gewählten Expressionssystems.

Figurenbeschreibung:

Fig. 1

Fig. 1A: Aminosäuresequenz des Channelopsin1 (Chop1) SEQ ID NO: 1 (AF385748)

Fig. 1B: Aminosäuresequenz des Channelopsin2 (Chop2) SEQ ID NO: 2 (AF461397)

Fig. 1C: Aminosäuresequenz des Bacterioopsins (Bop) aus *Halobacterium salinarum* (BR). Mit kleinen Buchstaben wird die *Leadersequenz* angezeigt, die *in vivo* abgespalten wird und aus historischen Gründen bei der Nummerierung der Aminosäuren nicht mitgezählt wird. In fetten Buchstaben sind die für die Protonenleitung essentiellen Aminosäuren gezeigt.

Fig. 1D: Vergleich der Aminosäuresequenzen von CHOP-1 (SEQ ID NO:1, AF385748) und CHOP-2 (SEQ ID NO:2, AF461397) aus *Chlamydomonas reinhardtii* mit der von Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum*. Aminosäuren, von denen für BR (Lücke et al. (1999) Science 286, 255-260 und darin erwähnte Literatur) bekannt ist, dass sie direkt mit dem Retinal wechselwirken, sind durch Sterne angezeigt. Aminosäurepositionen, die in mindestens zwei Sequenzen gleich sind, sind hellgrau unterlegt. Aminosäuren, die zu dem H⁺-leitenden Netzwerk in BR beitragen und die diesen entsprechenden Aminosäuren in den anderen Opsinen sind weiß auf schwarzem Grund. Für das His 173 von CHOP-1 wurde im Rahmen der Erfindung gezeigt, dass es an der Protonenleitung beteiligt ist. # indiziert die Position des Retinal-bindenden Lysins. Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen die 7 Transmembran-Helices des Core-Proteins an.

Fig. 2 Photoströme, die während der Belichtung von Oozyten mit grünem oder rotem Licht (500 ± 25 nm bzw. 700 ± 25 nm, 10^{22} Photonen, $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) registriert wurden. Haltepotential (V_h) = -100 mV, Lichtpuls durch den Balken angezeigt.

Badlösung = 96 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM MOPS, pH 7,5. A) Eine Oozyte, der keine CHOP-1-RNA injiziert wurde, bestrahlt mit grünem Licht B) eine CHOP-1-Oozyte, bestrahlt mit grünem Licht; C) dieselbe Oozyte wie in B), bestrahlt mit rotem Licht.

Fig. 3 Abhängigkeit des lichtinduzierten Einwärtsstroms von den Ionenbedingungen und der Spannung.

a: Ergebnisse mit einer (von fünf) charakteristischen CHOP-1-Oozyte, in der Reihenfolge der Messung (etwa 150 s Intervall), dargestellt, $V_h = -100$ mV, grünes Licht wie in Fig. 2. Die Lösungen sind mit 5 mM MOPS (pH 7,5) oder MES (pH 6) oder Citrat (pH 5 und 4) gepuffert. Konzentration in mM:

- | | |
|--|--|
| 1. 100 NaCl, 2 CaCl ₂ , pH 7,5 | 2. 100 NaCl, 2 CaCl ₂ , pH 6,0 (Referenz) |
| 3. 100 Na-Aspartat, 2 CaCl ₂ , pH 6,0 | 4. 100 NMG-Cl, 2 CaCl ₂ , pH 6,0 |
| 5: wie 2 | 6. 100 NaCl, 2 EGTA, 2 MgCl ₂ , pH 6,0 |
| 7: 200 Sorbit, 5 EGTA, pH 5,0 | 8: 200 Sorbit, 5 EGTA, pH 4,0 |

b: Strom-Spannungs-Verhältnisse der Photoströme von Fig. 3a, Konzentrationen siehe oben.

Fig. 4 Photoströme, die unter Variation des äußeren und inneren pH-Werts aufgezeichnet wurden, und deren Abhängigkeit von der Wellenlänge

a: Photostrom bei $V_h = +40$ mV. Ergebnisse von einer (von fünf) charakteristischen CHOP-1-Oozyten in einer Badlösung von NaCl (100 mM, Spur A: rotes Licht; Spur B: grünes Licht; 10^{22} Photonen $m^{-2} s^{-1}$) oder Natriumbutyrat (40 mM, +60 mM NaCl, Spur C: grünes Licht) von pH 7,4

b: Strom-Spannungs-Verhältnisse von Photoströmen in verschiedenen Badlösungen, die immer 100 μ M undissoziierte Buttersäure enthielten:

■, 60 mM NaCl + 40 mM Na-Butyrat, pH 7,4; ▲, 84 mM NaCl + 16 mM Na-Butyrat, pH 7,0; ▼, 93,6 mM NaCl + 6,4 mM Na-Butyrat, pH 6,6; ◆, 97,4 mM NaCl + 2,6 mM Na-Butyrat, pH 6,2;

c: pH-Abhängigkeit von Umkehrpotentialen aus b. Die punktierten Linien zeigen die theoretische Beziehung für einen konstanten pH_i von 6,6 bzw. 6,8 und -58 mV/pH. Die gestrichelte Linie zeigt die erwartete Beziehung für eine Steigung von -48 mV/pH-Differenz und $pH_i = 6,8$ bei $pH_o = 7,4$. Die Steigung von -48 mV/pH entspricht einem langsam abnehmenden pH_i (um 0,17 Einheiten pro pH_o -Abnahme von einer Einheit). ■, pH-Abhängigkeit von Umkehrpotentialen aus Versuchen mit 5,4 mM undissoziierter Essigsäure ($n = 3$). Die punktierte Linie zeigt die theoretische Beziehung für einen konstanten pH_i von 5,5 und -58 mV/pH.

d: Wellenlängenabhängigkeit des lichtinduzierten Einstromes bei pH_o 5,5 und -40 mV. Die Photoströme wurden für einen gleichen Photonenstrom normiert.

Die folgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung, ohne diese jedoch darauf zu beschränken.

BEISPIEL I

Amplifizierung von CHOP-1-DNAs und Expression von funktionsfähigen CHOP-1-Photorezeptoren in *Xenopus laevis*

Eine CHOP-1-DNA vollständiger Länge, kodierend für die Aminosäuren 1-712, und zwei kürzere CHOP-1-DNAs, kodierend für die Aminosäuren 1-346 bzw. 1-517 von CHOP-1, wurden von einer cDNA-Matrize vollständiger Länge mittels PCR unter Verwendung einer Polymerase mit Korrekturfunktion (pfu, Promega) und zwei Startoligonukleotiden (Primern), die BamHI- und HindIII-Restriktionsstellen enthielten, amplifiziert. Die Produkte wurden in den Vektor pGEMHE (Liman *et al.*, *Neuron* 9, 861-71 (1992)) inseriert und in *E. coli* kloniert. Nach Überprüfung der Sequenzen wurden die CHOP-1-DNAs *in vitro* transkribiert (Ambion) und 20 bis 30 ng cRNA in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert, wie bereits für Bakteriorhodopsin beschrieben (Nagel *et al.*, *FEBS Letters*, 377, 263-266 (1995)). Die Oozyten, die das CHOP-1-Protein exprimierten, wurden mit einem *all-trans*-Retinal (1 μ M) in Ringer'scher Lösung zwei bis fünf Tage lang inkubiert.

BEISPIEL II

Charakterisierung des CHOP-1-Photorezeptors

Zur Untersuchung der angenommenen Ionentransportfunktion wurden die CHOP-1-exprimierenden Oozyten unter Anwendung einer Zweielektroden-Spannungsklemmen-Technik, die bereits für Bakteriorhodopsin verwendet worden war (Nagel *et al.* *FEBS Letters*, 377, 263-266 (1995); Nagel *et al.*, *Biophysical Journal* 74, 403-412 (1998)) verschiedenen Experimenten unterworfen. Grünes Licht, nicht jedoch rotes Licht, induzierte einwärts gerichtete Ströme bei Oozyten, die eine der CHOP-1-RNAs exprimierten (Fig. 2). Das Auftreten von Photoströmen auch bei den kürzeren CHOP-1-RNDs demonstrierte, dass ein großer Teil des carboxyterminalen Bereichs von CHOP-1 für diese Funktion nicht erforderlich ist. Bei pH 6 und einer Transmembranspannung zwischen -100 und + 40 mV waren die Photoströme immer einwärts gerichtet (Fig. 3b). Der Ersatz von Chlorid durch Aspartat in der Lösung hatte keine nachweisbare Wirkung auf die Amplitude des Photostroms (Fig. 3a) oder dessen Strom-Spannungsverhältnis (Fig. 3b), ein Ergebnis, das Cl⁻ als transportiertes Ion ausschloß. Der Ersatz von Natrium durch N-Methyl-D-glucamin

(oder von NaCl durch Sorbit, Daten nicht gezeigt) führte zu einem ähnlichen einwärts gerichteten Strom (Fig. 3a) ohne Veränderung des Strom-Spannungsverhältnisses (Fig. 3b), was anzeigt, dass Na^+ von CHOP-1 nicht transportiert wird. Gleichmaßen ergab der Ersatz von Ca^{2+} durch Mg^{2+} keine Veränderung der Photoströme, ein Ergebnis, welches zeigte, dass Ca^{2+} ebenfalls nicht das transportierte Ion war (Fig. 3a,b).

Dagegen führte eine Erhöhung der Protonenkonzentration in der Badlösung, $[\text{H}^+]_o$, auf pH-Werte von 5 bzw. 4 bei Potentialen zwischen -100 und +40 mV zu deutlichen Anstiegen der einwärts gerichteten Photoströme (Fig. 3a,b).

Die bisher erhaltenen Ergebnisse verweisen somit auf H^+ -Ionen als Ladungsträger der lichtinduzierten Ströme. Aufgrund der eingangs erwähnten Sequenzhomologien zwischen dem CHOP-1-Protein und der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin lag zunächst die Annahme nahe, dass auch das CHOP-1-Protein Bestandteil eines aktiven Ionentransportsystems, nämlich einer Protonenpumpe wie Bakteriorhodopsin, wäre.

Während Bakteriorhodopsin jedoch bei allen getesteten Membranpotentialen von -60 mV bis +40 mV (siehe z.B. Nagel *et al.*, *Biophysical Journal* 74, 403-412 (1998)) auch gegen einen bestehenden pH-Gradienten Protonen immer nach außen transportiert, war die Transportrichtung des CHOP-1-Systems abhängig von dem über die Membran vorliegenden pH-Gradienten und dem Membranpotential (Fig. 4a,b,c). Die gemessenen Umkehrpotentiale bei verschiedenen Ausgangs-pH-Gradienten (Fig. 4b,c) belegen eindeutig, dass die lichtinduzierten Ströme rein passiver Natur sind. Aus den beobachteten hohen Photoströmen ist zu schließen, dass der Protonentransport nicht nur durch eine erleichterte Diffusion der Protonen durch die Membran vonstatten geht, sondern dass das CHOP-Protein ein Protonenkanal ist.

Die Abhängigkeit des lichtinduzierten einwärts gerichteten Photostroms bei pH 5,5 und -40 mV von der Wellenlänge des Lichts ist in Fig. 4d dargestellt. Das Maximum in der Nähe von 500 nm entspricht den Aktionsspektren für Photorezeptorströme, für Phototaxie- und Photoschock-Reaktionen intakter *C. reinhardtii*-Zellen.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Peter, Hegemann und Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e. V.

<120> Verwendung von biologischen Photorezeptoren als direkt
lichtgesteuerte Ionenkanäle

<130> P33838-019

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 712

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<220>

<223> Aminosäuresequenz von CHOP-1 (AF385748) aus
Chlamydomonas reinhardtii

<400> 1

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
85 90 95

Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
100 105 110

Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile
115 120 125

Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
130 135 140

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
145 150 155 160

Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn
165 170 175

Leu Thr Gly Leu Ala Asn Asp Tyr Asn Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
180 185 190

Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile Val Trp Gly Thr Thr Ala Ala Leu Ser
195 200 205

Lys Gly Tyr Val Arg Val Ile Phe Phe Leu Met Gly Leu Cys Tyr Gly
210 215 220

Ile Tyr Thr Phe Phe Asn Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Tyr His
225 230 235 240

Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Asp Leu Val Arg Tyr Leu Ala Trp
245 250 255

Leu Tyr Phe Cys Ser Trp Ala Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
260 265 270

Pro Glu Gly Phe Gly His Ile Asn Gln Phe Asn Ser Ala Ile Ala His
275 280 285

Ala Ile Leu Asp Leu Ala Ser Lys Asn Ala Trp Ser Met Met Gly His
290 295 300

Phe Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
305 310 315 320

Arg Lys Lys Gln Lys Val Asn Val Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu

325

330

335

Thr Met Val His Glu Glu Asp Asp Glu Thr Gln Lys Val Pro Thr Ala
340 345 350

Lys Tyr Ala Asn Arg Asp Ser Phe Ile Ile Met Arg Asp Arg Leu Lys
355 360 365

Glu Lys Gly Phe Glu Thr Arg Ala Ser Leu Asp Gly Asp Pro Asn Gly
370 375 380

Asp Ala Glu Ala Asn Ala Ala Ala Gly Gly Lys Pro Gly Met Glu Met
385 390 395 400

Gly Lys Met Thr Gly Met Gly Met Gly Met Gly Ala Gly Met Gly Met
405 410 415

Ala Thr Ile Asp Ser Gly Arg Val Ile Leu Ala Val Pro Asp Ile Ser
420 425 430

Met Val Asp Phe Phe Arg Glu Gln Phe Ala Arg Leu Pro Val Pro Tyr
435 440 445

Glu Leu Val Pro Ala Leu Gly Ala Glu Asn Thr Leu Gln Leu Val Gln
450 455 460

Gln Ala Gln Ser Leu Gly Gly Cys Asp Phe Val Leu Met His Pro Glu
465 470 475 480

Phe Leu Arg Asp Arg Ser Pro Thr Gly Leu Leu Pro Arg Leu Lys Met
485 490 495

Gly Gly Gln Arg Ala Ala Ala Phe Gly Trp Ala Ala Ile Gly Pro Met
500 505 510

Arg Asp Leu Ile Glu Gly Ser Gly Val Asp Gly Trp Leu Glu Gly Pro
515 520 525

Ser Phe Gly Ala Gly Ile Asn Gln Gln Ala Leu Val Ala Leu Ile Asn
530 535 540

Arg Met Gln Gln Ala Lys Lys Met Gly Met Met Gly Gly Met Gly Met
545 550 555 560

Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Met Gly Met Gly Met Gly Met Gly Met
565 570 575

Ala Pro Ser Met Asn Ala Gly Met Thr Gly Gly Met Gly Gly Ala Ser
580 585 590

Met Gly Gly Ala Val Met Gly Met Gly Met Gly Met Gln Pro Met Gln
595 600 605

Gln Ala Met Pro Ala Met Ser Pro Met Met Thr Gln Gln Pro Ser Met
610 615 620

Met Ser Gln Pro Ser Ala Met Ser Ala Gly Gly Ala Met Gln Ala Met
625 630 635 640

Gly Gly Val Met Pro Ser Pro Ala Pro Gly Gly Arg Val Gly Thr Asn
645 650 655

Pro Leu Phe Gly Ser Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ser Gln Pro Gly Ile
660 665 670

Ser Pro Gly Met Ala Thr Pro Pro Ala Ala Thr Ala Ala Pro Ala Ala
675 680 685

Gly Gly Ser Glu Ala Glu Met Leu Gln Gln Leu Met Ser Glu Ile Asn
690 695 700

Arg Leu Lys Asn Glu Leu Gly Glu
705 710

<210> 2

<211> 737

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<220>

<223> Aminosäuresequenz von CHOP-2 (AF461397) aus
Chlamydomonas reinhardtii

<400> 2

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
20 25 30

Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
35 40 45

Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
50 55 60

Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
65 70 75 80

Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
85 90 95

Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
100 105 110

Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys
115 120 125

Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
130 135 140

Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
145 150 155 160

Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
165 170 175

Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
180 185 190

Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
195 200 205

Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
210 215 220

Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
225 230 235 240

Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
245 250 255

Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
260 265 270

Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285

Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300

Glu Ala Gly Ala Val Asn Lys Gly Thr Gly Lys Tyr Ala Ser Arg Glu
 305 310 315 320

Ser Phe Leu Val Met Arg Asp Lys Met Lys Glu Lys Gly Ile Asp Val
 325 330 335

Arg Ala Ser Leu Asp Asn Ser Lys Glu Val Glu Gln Glu Gln Ala Ala
 340 345 350

Arg Ala Ala Met Met Met Met Asn Gly Asn Gly Met Gly Met Gly Met
 355 360 365

Gly Met Asn Gly Met Asn Gly Met Gly Gly Met Asn Gly Met Ala Gly
 370 375 380

Gly Ala Lys Pro Gly Leu Glu Leu Thr Pro Gln Leu Gln Pro Gly Arg
 385 390 395 400

Val Ile Leu Ala Val Pro Asp Ile Ser Met Val Asp Phe Phe Arg Glu
 405 410 415

Gln Phe Ala Gln Leu Ser Val Thr Tyr Glu Leu Val Pro Ala Leu Gly
 420 425 430

Ala Asp Asn Thr Leu Ala Leu Val Thr Gln Ala Gln Asn Leu Gly Gly
 435 440 445

Val Asp Phe Val Leu Ile His Pro Glu Phe Leu Arg Asp Arg Ser Ser
 450 455 460

Thr Ser Ile Leu Ser Arg Leu Arg Gly Ala Gly Gln Arg Val Ala Ala
 465 470 475 480

Phe Gly Trp Ala Gln Leu Gly Pro Met Arg Asp Leu Ile Glu Ser Ala
 485 490 495

Asn Leu Asp Gly Trp Leu Glu Gly Pro Ser Phe Gly Gln Gly Ile Leu
 500 505 510

Pro Ala His Ile Val Ala Leu Val Ala Lys Met Gln Gln Met Arg Lys
 515 520 525

Met Gln Gln Met Gln Gln Ile Gly Met Met Thr Gly Gly Met Asn Gly
530 535 540

Met Gly Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Asn Gly Met Gly Gly Gly Asn
545 550 555 560

Gly Met Asn Asn Met Gly Asn Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Asn Gly
565 570 575

Met Gly Gly Asn Gly Met Asn Gly Met Gly Gly Gly Asn Gly Met Asn
580 585 590

Asn Met Gly Gly Asn Gly Met Ala Gly Asn Gly Met Gly Gly Gly Met
595 600 605

Gly Gly Asn Gly Met Gly Gly Ser Met Asn Gly Met Ser Ser Gly Val
610 615 620

Val Ala Asn Val Thr Pro Ser Ala Ala Gly Gly Met Gly Gly Met Met
625 630 635 640

Asn Gly Gly Met Ala Ala Pro Gln Ser Pro Gly Met Asn Gly Gly Arg
645 650 655

Leu Gly Thr Asn Pro Leu Phe Asn Ala Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ser
660 665 670

Gln Leu Gly Ala Glu Ala Gly Met Gly Ser Met Gly Gly Met Gly Gly
675 680 685

Met Ser Gly Met Gly Gly Met Gly Gly Met Gly Gly Met Gly Gly Ala
690 695 700

Gly Ala Ala Thr Thr Gln Ala Ala Gly Gly Asn Ala Glu Ala Glu Met
705 710 715 720

Leu Gln Asn Leu Met Asn Glu Ile Asn Arg Leu Lys Arg Glu Leu Gly
725 730 735

Glu

<210> 3

<211> 259

<212> PRT

<213> Halobacterium salinarum

<220>

<223> Aminosäuresequenz von Bakteriorhodopsin aus
Halobacterium salinarum

<400> 3

Met	Leu	Pro	Thr	Ala	Val	Glu	Gly	Val	Ser	Gln	Ala	Gln	Ile	Thr	Gly
1				5					10					15	

Arg	Pro	Glu	Trp	Ile	Trp	Leu	Ala	Leu	Gly	Thr	Ala	Leu	Met	Gly	Leu
			20					25					30		

Gly	Thr	Leu	Tyr	Phe	Leu	Val	Lys	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Asp	Pro	Asp
		35					40					45			

Ala	Lys	Lys	Phe	Tyr	Ala	Ile	Thr	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	Ile	Ala	Phe
	50					55					60				

Thr	Met	Tyr	Leu	Ser	Met	Leu	Leu	Gly	Tyr	Gly	Leu	Thr	Met	Val	Pro
65					70					75					80

Phe	Gly	Gly	Glu	Gln	Asn	Pro	Ile	Tyr	Trp	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asp	Trp
				85					90					95	

Leu	Phe	Thr	Thr	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Asp
			100					105						110	

Ala	Asp	Gln	Gly	Thr	Ile	Leu	Ala	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Ile	Met
		115					120					125			

Ile	Gly	Thr	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Thr	Lys	Val	Tyr	Ser	Tyr	Arg
	130					135					140				

Phe	Val	Trp	Trp	Ala	Ile	Ser	Thr	Ala	Ala	Met	Leu	Tyr	Ile	Leu	Tyr
145					150					155					160

Val	Leu	Phe	Phe	Gly	Phe	Thr	Ser	Lys	Ala	Glu	Ser	Met	Arg	Pro	Glu
				165					170					175	

Val	Ala	Ser	Thr	Phe	Lys	Val	Leu	Arg	Asn	Val	Thr	Val	Val	Leu	Trp
			180					185						190	

Ser Ala Tyr Pro Val Val Trp Leu Ile Gly Ser Glu Gly Ala Gly Ile
195 200 205

Val Pro Leu Asn Ile Glu Thr Leu Leu Phe Met Val Leu Asp Val Ser
210 215 220

Ala Lys Val Gly Phe Gly Leu Ile Leu Leu Arg Ser Arg Ala Ile Phe
225 230 235 240

Gly Glu Ala Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala Gly Asp Gly Ala Ala Ala
245 250 255

Thr Ser Asp

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung eines biologischen Photorezeptors als lichtgesteuerten Ionenkanal zur Veränderung der Ionenleitfähigkeit einer Membran mit Hilfe von Licht. Der verwendete Photorezeptor umfasst ein Apoprotein und ein kovalent an das Apoprotein gebundenes lichtsensitives Polyen, das mit dem Apoprotein wechselwirkt und als lichtempfindliches Tor fungiert. ???
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Apoprotein ein Transmembranprotein mit 5 oder mehr Transmembranhelices ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Ionentransportsystem ein Protonentransportsystem ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Apoprotein ein Opsin-Protein oder ein Derivat oder Fragment eines natürlich vorkommenden Opsin-Proteins ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Opsin-Derivat oder -Fragment das Ergebnis eines Austausches und/oder einer Insertion und/oder Deletion von einer oder mehreren Aminosäure(n) in der natürlichen Aminosäuresequenz des Opsin-Proteins ist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die dem Bakteriorhodopsin-Asp⁹⁶ entsprechende Aminosäure eine andere Aminosäure als Asp ist und in dem Apoprotein mindestens 8 der weiteren 16 Aminosäuren, die im Bakteriorhodopsin am Protonentransportnetzwerk beteiligt sind, identisch erhalten oder durch konservativen Austausch verändert sind.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens die Aminosäuren, die im Bakteriorhodopsin den Aminosäuren T⁴⁶, Y⁵⁷, R⁸², T⁸⁹, T¹⁰⁷, W¹⁸², D²¹², K²¹⁶ entsprechen, an der entsprechenden Position identisch erhalten sind.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Apoprotein die Konsensussequenz L(I)DxxxKxxW(F,Y) enthält.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Apoprotein aus niederen Pflanzen stammt.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die niederen Pflanzen Algen sind.
11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Apoprotein ein Opsin-Protein aus *Chlamydomonas reinhardtii* ist.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens die Aminosäuren 61 bis 310 des Channelopsin1 (Chop1) gemäss SEQ ID NO:1 (AF385748) (National Center for Biotechnology Information, NCBI) umfasst.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens die Aminosäuren 24 bis 268 des Channelopsin2 (CHOP 2) gemäss SEQ ID NO:2 (AF461397) umfasst.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Opsin-Protein von Protozoen stammt.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Opsin-Protein von Bakterien oder Archaeen stammt.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Opsin-Protein aus Pilzen stammt.
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das lichtensitive Polyen ein Retinal oder Retinalderivat ist.

18. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Retinalderivat aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: 3,4-Dehydroretinal, 13-Ethylretinal, 9-dm-Retinal, 3-Hydroxyretinal, 4-Hydroxyretinal, Naphthylretinal; 3,7,11-Trimethyl-Dodeca-2,4,6,8,10-Pentaenal; 3,7-Dimethyl-Deca-2,4,6,8-Tetraenal; 3,7-Dimethyl-Octa-2,4,6-Trienal; sowie 6-7 oder 8-9, oder 10-11-Rotations-blockierte Retinale.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 18 zur lichtgesteuerten Veränderung der Protonenleitfähigkeit der Membran.
20. Verwendung eines lichtgesteuerten Ionenkanals nach einem der Ansprüche 1 bis 18 zur lichtgesteuerten Veränderung des Membranpotentials einer Zelle.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 - 20, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Membran um die Zellmembran einer Hefe (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*) handelt.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 - 20, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Membran um die Zellmembran einer Säugetierzelle (z. B. COS, BHK, HEK293, CHO, Myeloma-Zellen, MDCK, Baculovirus infizierte sf9-Zellen) handelt.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur lichtgesteuerten Erhöhung oder Erniedrigung der intrazellulären Konzentration von Ionen.
24. Verwendung nach Anspruch 23 zur lichtgesteuerten Erhöhung oder Erniedrigung der intrazellulären Protonenkonzentration.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 18 zur Messung der intrazellulären Protonenkonzentration direkt an der Plasmamembran oder eines Protonenkonzentrationsgradienten über der Plasmamembran mit Hilfe von Strom-Spannungskurven, wobei der Protonenkonzentrationsgradient aus

der Differenz der Strom-Spannungskurven mit und ohne Belichtung aus dem Umkehrpotential direkt ermittelt werden kann.

26. Verwendung eines lichtgesteuerten Ionenkanals nach einem der Ansprüche 1 bis 18 zum Hochdurchsatzscreening von biologischen Molekülen.
27. Verwendung nach Anspruch 26 zum Hochdurchsatzscreening von pH-regulierten Membranproteinen.
28. Verwendung nach Anspruch 26 zum Hochdurchsatzscreening von spannungsabhängigen Membranproteinen.
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass der lichtgesteuerte Ionenkanal in Kombination mit einem lichtgesteuerten aktiven Ionentransportsystem eingesetzt wird.

Zusammenfassung

Verwendung eines biologischen Photorezeptors als lichtgesteuerten Ionenkanal zur Veränderung der Ionenleitfähigkeit einer Membran mit Hilfe von Licht. Der verwendete Photorezeptor umfasst ein Apoprotein und ein kovalent an das Apoprotein gebundenes lichtsensitives Polyen, das mit dem Apoprotein wechselwirkt und als lichtempfindliches Tor fungiert.

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSY
TLENNGSVICIPNNGQCFCCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTW
KSTCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTWVLRYAEWLLTCPVILHLS
NLTGLANDYNKRTMGLLVSDIGTIVWGTTAALSKGYVRVIFFLMGLCYGIYTFFNAAKV
YIEAYHTVPGICRDLVRYLAWLYFCSWAMFPVLFLLGPEGFGHINQFNSAIAHAILDL
ASKNAWSMMGHFLRVKIHEHILLYGDIRKKQKVNVAQGEMEVETMVHEEDDETQKV
PTAKYANRDSFIIMRDLKEKGFETRASLDGDPNGDAEANAAGGKPGMEMGKMTG
MGMGMGAGMGMATIDSGRVILAVPDISMVDFFREQFARLPVPYELVPALGAENTLQL
VQQAQSLGGCDFVLMHPEFLRDRSPTGLLPRLKMGGQRAAAFGWAAIGPMRDLIEG
SGVDGWLEGPSFGAGINQQALVALINRMQQAKKMGMGMGMGMGMGMGMGMGMGMGMGM
GMGMGMAPSMNAGMTGGMGGASMGGAVMGMGMGMGMQPMQQAMPAMSPMMTQ
QPSMMSQPSAMSAGGAMQAMGGVMPSAPGGRVGTNPLFGSAPSPSSQPGISP
GMATPPAATAAPAAGGSEAEMLQQLMSEINRLKNELGE

Fig. 1A

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQ
WLAAGFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGH
RVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGY
VKVIFFCLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPIL
FILGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIG
GTEIEVETLVEDEAEAGAVNKGTGKYASRESFLVMRDKMKEKGIDVRASLDNSKEVE
QEQAARAAMMMMNNGNGMGMGMGMNGMNGMGMGMNGMAGGAKPGLELTPQLQP
GRVILAVPDISMVDFFREQFAQLSVTYELVPALGADNTLALVTQAQNLGGVDFVLIHP
EFLRDRSSTSILSRLRGAGQRVAAFGWAQLGPMRDLIESANLDGWLEGPSFGQGILP
AHIVALVAKMQQMRKMQQMQQIGMMTGGMNGMGGGMGGGMNGMGGGNGMNN
MGNGMGGGMGNGMGNGMNGMGGGNGMNNMGNGMAGNGMGGGMGGNGM
GGSMNGMSSGVVANVTPSAAGGMGGMMNGGMAAPQSPGMNGGRLGTNPLFNAA
PSPLSSQLGAEAGMGSMGGMGGMSGMGGMGGMGGMGGAGAATTQAAGGNAEA
EMLQNLMMNEINRLKRELGE

Fig 1B

MlptavegvsqAQITGRPEWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMGVSDPDAKKFYAITTLVPAIAFT
MYLSMLLGYGLTMVPFGGEQNPIYWARYADWLFTTPLLALLVDADQGTILALVGADG
IMIGTGLVGALTKVYSYRFVWWAISTAAMLYILYVLFFGFTSKAESMRPEVASTFKVLRNVT
VWLWSAYPVVWLIGSEGAGIVPLNIETLLFMVLDVSAKVGFGILLRSRAIFGEAEAPEPSAG
DGAAATSD

Fig. 1C

Chop1..-----PQISPGMATPPAAATAAPAGGSAEEMIQQLMSLNRIN-ELGK 712
Chop2..EAGMGSMGGMGGMSGMGGMGGMGGAGAAATQAAGNAAEEMIQQLMNLNRLKRELGE 737

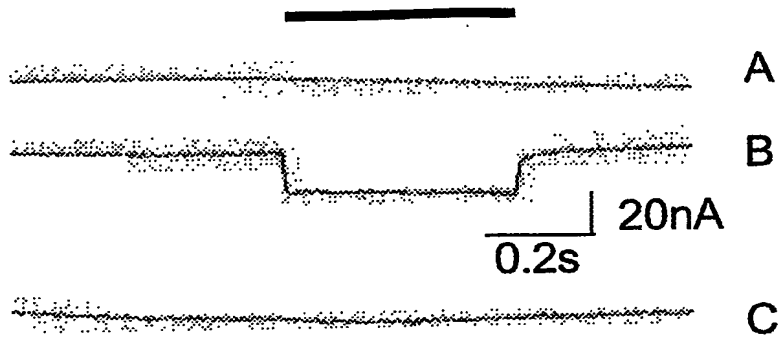
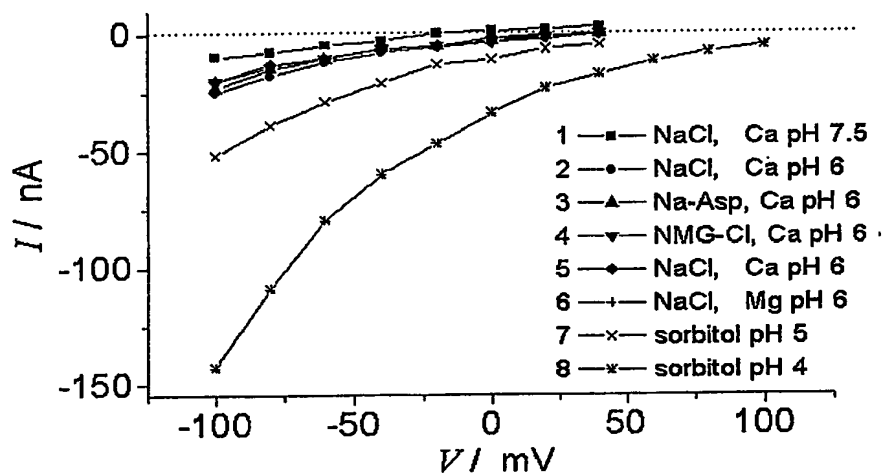
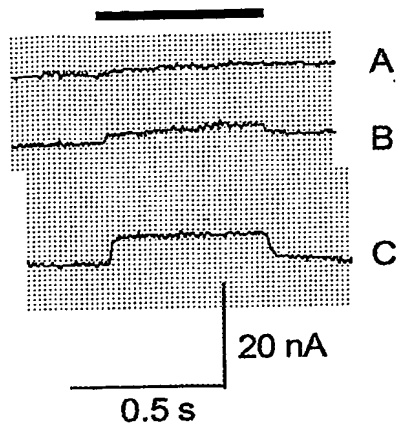
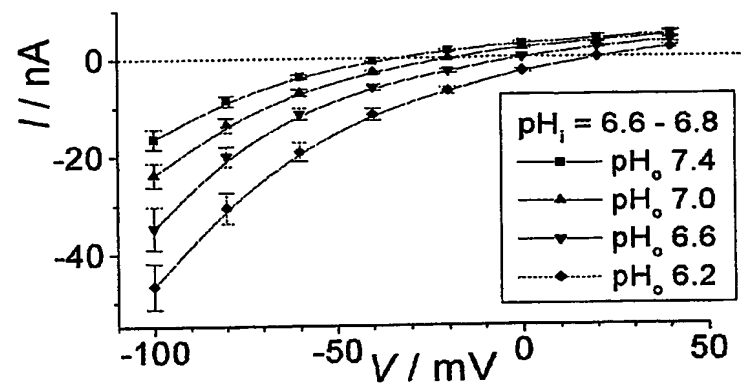
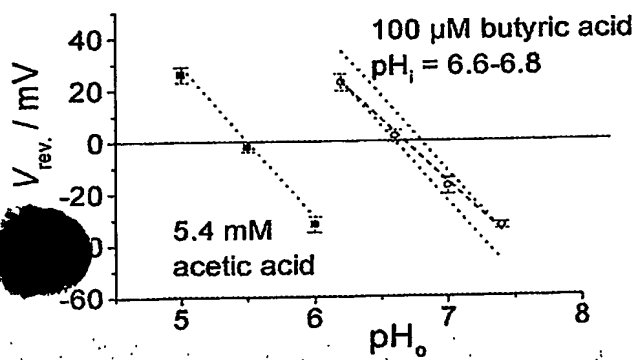
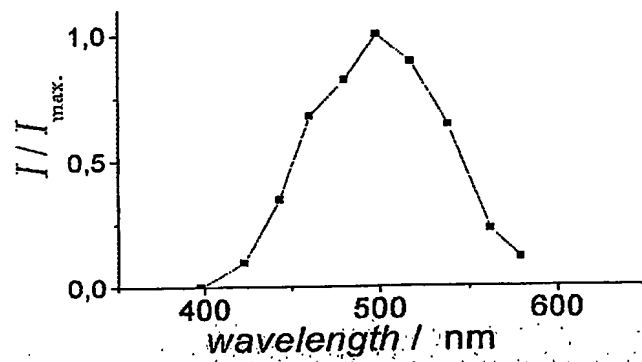


Fig. 2

a**b****Fig. 3**

a**b****c****d****Fig. 4**